

Možnosti a změny při zpracování vzorků kostní dřeně po aktivaci přístrojů umožňujících selekci MM buněk ve vysoké čistotě i při minimální vstupní infiltraci

Mgr. Silvie Dudová, RNDr. Iva Burešová, Drahomíra Kyjovská

Centrum základního výzkumu pro monoklonální gamapatie a mnohočetný myelom, ILBIT LF MU Brno

Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, OKH FN Brno



MACS separace

- CD138 mikrokuličky - superparamagnetické částice, 50 nm
- biodegradovatelná matrix, odpadá nutnost odstraňovat je z buněk po separaci
- nemění strukturu, funkci nebo aktivitu značených buněk
- pozitivní selekce: v separátoru silné magnetické pole - zadržuje pouze značené buňky, ty jsou vymyty po odstranění kolony z magnetického pole



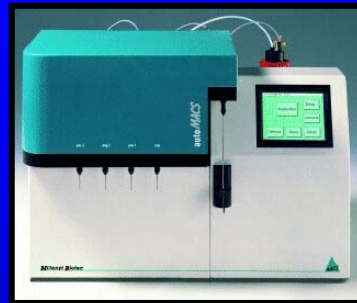
MACS separace

VarioMACS

- nízká účinnost separace při infiltraci KD < 10%
- pracná metoda

Nové přístroje

- AUTOMACS
- FACS-ARIA



VarioMACS

40 - 60ml KD

gradientová centrifugace

MB > 10%

MB ≤ 10%

MACS selekce

kryokonzervace

CD 138+

CD 138-

kryokonzervace kryokonzervace

AutoMACS

40 - 60ml KD

gradientová centrifugace

MB > 0% infiltrace

vysoká buněčnost

lyzační pufr pro odstranění ery

MACS selekce

CD 138+

CD 138-

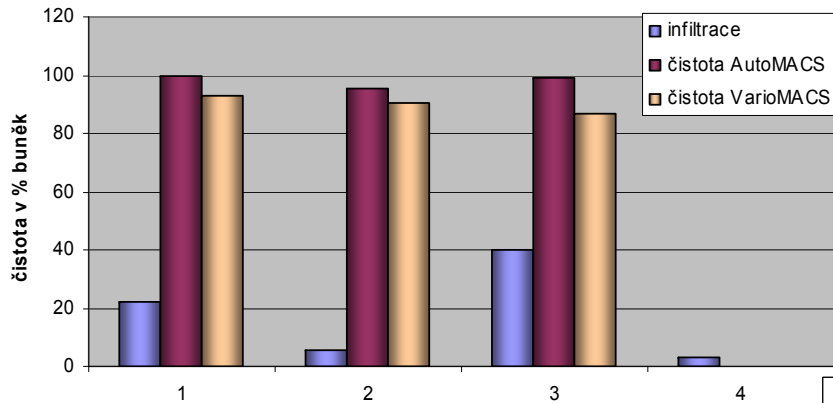
kryokonzervace kryokonzervace

nízká buněčnost

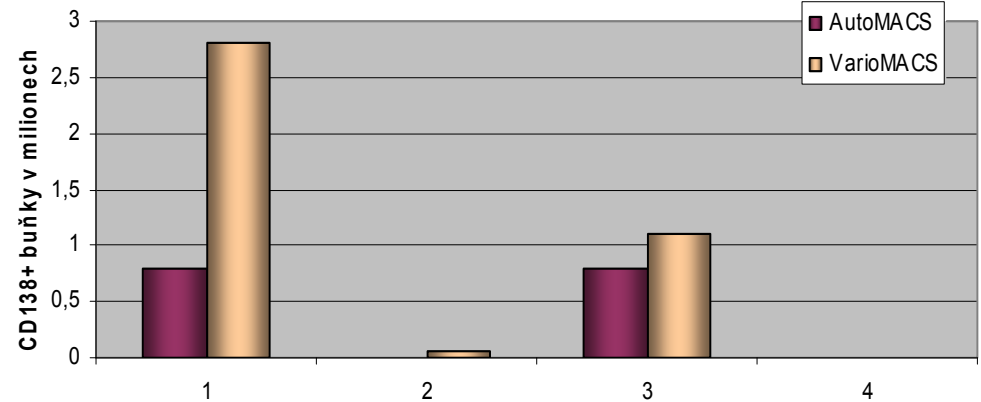
kryokonzervace

Dosavadní výsledky

Srovnání čistoty frakce CD138+ buněk



Zisk CD138+ buněk



FACS Aria

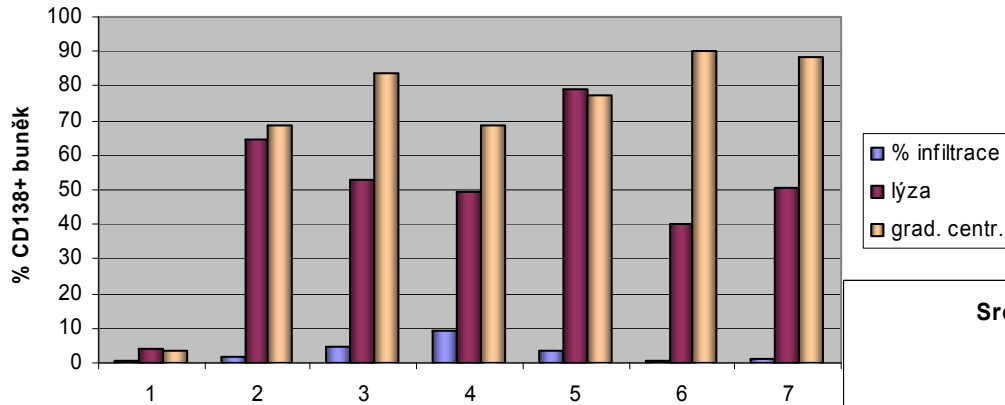


- vysokorychlostní sorter
- sortovat až 4 různé populace buněk z jednoho vzorku
- podle potřeby - maximální čistota nebo maximální výtěžek

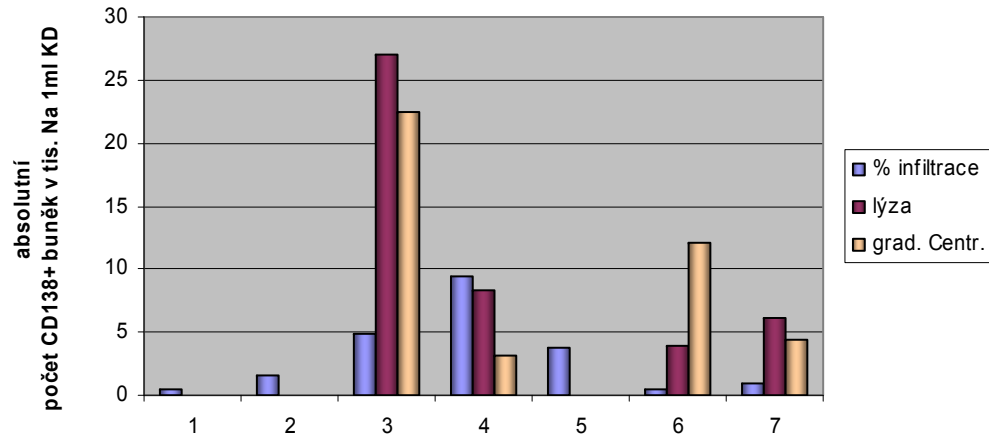
- 2 postupy přípravy buněk - lýza erytrocytů lyzačním roztokem s NH_4Cl a separaci gradientovou centrifugací
- buňky obarveny protilátkou proti CD138 značenou phycoerytrinem (PE)

FACS Aria

Srovnání čistoty vysortované CD138+ populace po přípravě lýzou a gradientovou centrifugací



Srovnání výtěžku vysortované CD138+ populace po přípravě lýzou a gradientovou centrifugací



FACS Aria - první poznatky

- postačuje 1 znak (CD138) pro sortování myelomových bb
 - výsledná čistota není jednoduše závislá na iniciálním procentuálním zastoupení této populace v KD
 - čistota vyšší po gradientové centrifugaci
 - absolutní počet získaných CD138+ buněk je vyšší po lyzaci KD
-
- čistota a výtěžek myelomových buněk „jdou proti sobě“, takže nebude snadné rozhodnout se pro určitý způsob zpracování KD před sortem



Využití buněk KD doposud:

- 2 ml KD → cytogenetika
- 3 ml KD v EDTA → izolace RNA a DNA → Bank on a cure (IFM), cytogenetika (CGH)
- 1 ml flowcytometrie

- 60 ml KD → separace bb → epigenetika: $1,5 \times 10^6$
→ proteomika: 3×10^6



Využití CD138+ buněk nově:

- 1.5 ml KD v EDTA → izolace DNA → Bank of cure (IFM)
- 0.5 ml KD → flowcytometrie

Využití separovaných buněk:

- FISH 200 tis
- CGH 500 tis. (50 buněk)
- real-time PCR 500 tis
- proteomika $1,5 \times 10^6$
- epigenetika $1,5 \times 10^6$
- GEP 1×10^6

Celkem: 5×10^6 buněk



Materiál pro jednotlivé metody:

MACS

buňky: FISH (200 tis)
proteomika: $1,5 \times 10^6$
epigenetika: $1,5 \times 10^6$

RNA: real time PCR (500 tis)
GEP (1×10^6)

DNA: CGH (50 tis)

Otázky:

- Co upřednostnit? Vyšší čistota nebo více buněk?
- Jaké jsou priority využití CD138+ buněk?



PODĚKOVÁNÍ

Centrum základního výzkumu pro monoklonální gamapatie a mnohočetný myelom, ILBIT LF MU Brno

Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie FN Brno

Oddělení klinické hematologie FN Brno

Interní hematoonkologická klinika FN Brno

